

**This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 2001-149090

(43)Date of publication of application : 05.06.2001

(51)Int.Cl.

C12P 41/00
// (C12P 41/00
C12R 1:38)

(21)Application number : 11-337812

(71)Applicant : DAISO CO LTD

(22)Date of filing : 29.11.1999

(72)Inventor : SUZUKI TOSHIO
IDOGAKI HIDESATO
NAKAGAWA ATSUSHI
KASAI NAOYA

(54) PRODUCTION OF (S)-3-HALOGENO-1,2-PROPANEDIOL BY MICROORGANISM

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To produce (S)-3-halogeno-1,2-propanediol by an inexpensive and industrially convenient method.

SOLUTION: By cultivating a microorganism belonging to the genus Pseudomonas which has the ability of assimilating (R)-3-halogeno-1,2-propanediol and is capable of growing by using the (R) compound as a single carbon source in a culture medium containing a racemic 3-halogeno-1,2-propanediol as a substrate, the assimilative decomposition of (R)-3-halogeno-1,2-propanediol is preferentially carried out to give (S)-3-halogeno-1, 2-propanediol.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2000 Japan Patent Office

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2001-149090

(P2001-149090A)

(43) 公開日 平成13年6月5日 (2001.6.5)

(51) Int.Cl.	識別記号	F I	テ-マ-ト (参考)
C 1 2 P 41/00		C 1 2 P 41/00	C 4 B 0 6 4
// (C 1 2 P 41/00		(C 1 2 P 41/00	
C 1 2 R 1:38)		C 1 2 R 1:38)	

審査請求 未請求 請求項の数4 O L (全 5 頁)

(21) 出願番号 特願平11-337812

(22) 出願日 平成11年11月29日 (1999.11.29)

(71) 出願人 000108993

ダイソー株式会社

大阪府大阪市西区江戸堀1丁目10番8号

(72) 発明者 鈴木 利雄

大阪府大阪市西区江戸堀1丁目10番8号

ダイソー株式会社内

(72) 発明者 井戸垣 秀聡

大阪府大阪市西区江戸堀1丁目10番8号

ダイソー株式会社内

(74) 代理人 100062144

弁理士 青山 稔 (外2名)

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 微生物による (S) - 3 - ハロゲノ - 1, 2 - プロパンジオールの製法

(57) 【要約】

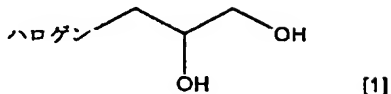
【課題】 S体3-ハロゲノ-1, 2-プロパンジオールを安価で、かつ工業的に簡便な方法で製造すること。

【解決手段】 R体3-ハロゲノ-1, 2-プロパンジオールの資化能を有し、そのR体を単一炭素源として生育しうるシュードモナス属に属する微生物を、ラセミ体3-ハロゲノ-1, 2-プロパンジオールを基質として含有する培地中で培養することにより、R体3-ハロゲノ-1, 2-プロパンジオールを優先的に資化分解させ、S体3-ハロゲノ-1, 2-プロパンジオールを分取する。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 下記式 [1]

【化1】



で示される3-ハロゲノ-1, 2-プロパンジオールのR体の資化能を有し、該R体を単一炭素源として生育しうるシュードモナス属に属する微生物を、3-ハロゲノ-1, 2-プロパンジオール [1] のラセミ体を基質として含有する培地中で培養し、該培養物より3-ハロゲノ-1, 2-プロパンジオール [1] のS体を分取することを特徴とする該S体の製法。

【請求項2】 3-ハロゲノ-1, 2-プロパンジオール [1] のラセミ体を単一炭素源とする培地中で培養することを特徴とする請求項1の3-ハロゲノ-1, 2-プロパンジオール [1] のS体の製法。

【請求項3】 基質として3-クロロもしくはブロモ-1, 2-プロパンジオールを用いる請求項1または2の3-クロロもしくはブロモ-1, 2-プロパンジオールのS体の製法。

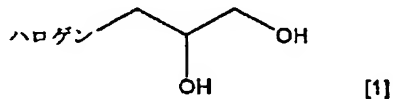
【請求項4】 微生物がシュードモナス (*Pseudomonas*) sp. DS-SI-5株 (FERM P-17596) である請求項1、2または3に記載のS体の製法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】 本発明は下記式

【化2】



で示される3-ハロゲノ-1, 2-プロパンジオールのR体(以下単にR体 [1] と記すこともある。)を単一炭素源として資化増殖する能力を有する微生物を用いて、3-ハロゲノ-1, 2-プロパンジオールのラセミ体(以下単にラセミ体 [1] と記すこともある。)より、そのS体を分取する方法に関するものであり、本発明により得られる3-ハロゲノ-1, 2-プロパンジオールのS体(以下単にS体 [1] と記すこともある。)は、医薬品・農薬・生理活性物質などの光学活性化合物の製造の中間体として極めて重要、かつ有用な化合物である。

【0002】

【従来の技術】 微生物あるいは酵素による光学活性S体 [1] の製法に関して以下のような方法が知られている。ラセミ体 [1] に微生物を作用させ、R体 [1] を分解し、残存するS体 [1] を回収する製法としては高橋らの製法(特開昭62-122596、特開昭63-36798)と二階堂らの製法(特開平6-20978

1) が知られている。両方法とも、使用する微生物がラセミ体 [1] よりR体 [1] を立体選択的に分解代謝する能力を有するが、R体 [1] を炭素源として資化増殖する能力を有しておらず、ラセミ体 [1] を単一炭素源とし、硫酸アンモニウムや硝酸アンモニウムなどの無機窒素体を窒素源とする完全合成培地では生育増殖することはできない。従って、これらの方法においては、ラセミ体 [1] よりS体 [1] を得るには、用いる微生物が生育することができる栄養培地にて菌体を別途多量に増殖させた後、ラセミ体 [1] に作用させるか、または微生物が生育することができる栄養培地にラセミ体 [1] を添加して作用させなければならない。

【0003】 特に前者の高橋らの方法は、R体 [1] が酸化的に分解代謝される反応を利用した方法であり、反応を効率的に進行させるためには、グルタチオンや水酸化ナトリウムあるいは水酸化カリウムなどのSH基含有化合物を添加する必要がある。一方、後者の二階堂らの方法は、本発明方法と同じくシュードモナス属に属する菌を用いる方法であるが、その菌はR体 [1] の資化増殖能力を有しておらず、ラセミ体 [1] を単一炭素源とする完全合成培地中ではその菌の生育増殖反応を伴うR体 [1] の分解資化反応が起きず、従ってS体 [1] を得ることができない。よってこれら両方法は、いずれも、ラセミ体 [1] の光学分割、および得られるS体 [1] の回収、精製という観点から簡便かつ実際的な方法ではなく、工業生産の観点からも経済的な製法とは言い難い。

【0004】

【発明が解決しようとする課題】 本発明はこれら従来の方法に比べ、より経済的に安価で、かつ技術的に簡便な方法により、ラセミ体 [1] からS体 [1] を製造することを目的とするものである。

【0005】

【課題を解決するための手段】 本発明者らは、ラセミ体 [1] よりR体 [1] を優先的に資化分解する能力を有し、さらにR体 [1] を単一炭素源として資化増殖することのできる微生物を求め、鋭意研究した結果、目的とする微生物の単離に成功し、本発明を完成するに至った。すなわち、本発明は3-ハロゲノ-1, 2-プロパンジオールのR体の資化能を有し、該R体を単一炭素源として生育しうるシュードモナス属に属する微生物(以下本発明に係る微生物と記すこともある。)を、3-ハロゲノ-1, 2-プロパンジオール [1] のラセミ体を基質として含有する培地中で培養し、該培養物より3-ハロゲノ-1, 2-プロパンジオール [1] のS体を分取することを特徴とする該S体の製法に関する。本発明で基質として用いることのできるラセミ体 [1] のハロゲン原子の種類としては、クロル原子もしくはブrom原子が好ましい。

【0006】 本発明につき、さらに具体的に説明する。

ラセミ体〔1〕を単一炭素源とし、各種アンモニウム塩や硝酸塩等の無機態窒素を窒素源として、その他微量の金属塩やリン酸塩等の無機塩類を加えた完全合成培地に本発明に係る微生物を接種し、培養或いは作用させ、R体〔1〕を資化せしめ、培養液より残存するS体〔1〕を分取するか、あるいはラセミ体〔1〕を基質として含有するブイオン培地やペプトン培地等の有機態炭素源ならびに窒素源、そして必要により、無機塩、微量の金属塩、ビタミン類などを含む通常一般によく用いられる栄養培地中で本発明に係る微生物を培養し、R体〔1〕を資化せしめ、培養物より残存するS体〔1〕を分取してもよい。

【0007】本発明は、つまり本発明に係る微生物によるラセミ体〔1〕からの優先的なR体〔1〕の資化分解反応により、反応液あるいは培養液にS体〔1〕を残存させ回収する方法である。資化反応は用いる微生物の至適pH、至適温度の範囲内で行うのがよい。なお、本発明に係る微生物は、R体〔1〕を炭素源として利用し資化増殖するに当たり、脱ハロゲン化反応により分解されるR体〔1〕と等量のハロゲン化水素酸を生成する。資化反応の進行に伴いR体〔1〕より遊離するハロゲン化水素酸によりpHが徐々に低下する場合、適当なアルカリ源を添加することにより反応液中のpHを至適範囲内にコントロールする必要がある。例えば、炭酸カルシウム溶液、炭酸ナトリウム溶液、炭酸カリウム、炭酸アンモニウムなどの炭酸アルカリ水溶液、水酸化ナトリウム水溶液、水酸化カリウム水溶液、水酸化カルシウム水溶液などの水酸化アルカリ水溶液、あるいはアンモニア水溶液など通常、酸を中和させることができるものを用いて、pHを至適範囲内にコントロールするのがよい。

【0008】本発明に係る微生物を培養し、R体の資化反応を惹起させるための培地としては、ラセミ体〔1〕を単一炭素源とし、各種アンモニウム塩や硝酸塩等の無機態窒素を窒素源として、その他微量の金属塩やリン酸塩等の無機塩類を加えた完全合成培地を使用することは経済的見地から好ましいが、ラセミ体〔1〕を基質として含有する通常この種の微生物が生育する培地ならば何でも使用することができる。例えばグルコース、フラクトース等の炭水化物、グリセロール、ソルビトール、マンニトール等のアルコール類、酢酸、クエン酸、リンゴ酸、マレイン酸、フマル酸、グルコン酸などの有機酸またはその塩類、またはそれらの混合物を炭素源として用いることができる。

【0009】窒素源として硫酸アンモニウム、硝酸アンモニウム、リン酸アンモニウム等の無機窒素化合物、尿素、ペプトン、カゼイン、酵母エキス、肉エキス、コーンステープリカー等の有機窒素化合物とそれらの混合物を挙げることができる。その他、無機塩としてリン酸塩、マグネシウム塩、カリウム塩、マンガン塩、鉄塩、亜鉛塩、銅塩など、さらに必要に応じてビタミン類を加えてもよ

い。上記微生物の培養は常法によればよく、例えばpHを4～10、好ましくは5～9、培養温度は15～50℃、好ましくは20～37℃の範囲で振とう培養あるいは通気攪拌培養等の方法を用いて好氣的に20～96時間行なうことが好ましい。本発明に係る微生物は、予めブイオン培地やペプトン培地等の有機態炭素源ならびに窒素源、そして必要により、無機塩、微量の金属塩、ビタミン類などを含む通常一般によく用いられる栄養培地中で予め培養してもよい。また、高酵素活性を持った菌体を得るための酵素誘導添加物として、上記培地、ペプトン培地、ブイオン培地等の栄養培地にラセミ体3-クロロ-1, 2-プロパンジオール、ラセミ体3-ブロモ-1, 2-プロパンジオール等の3-ハロゲノ-1, 2-プロパンジオールを添加してもよい。

【0010】反応液中のラセミ体〔1〕の基質濃度は0.1～15% (v/v) が好ましく、基質は初期に一括して加えてもよいし、分割添加してもよい。反応は通常、攪拌あるいは振とう、あるいは通気攪拌培養等の方法を用いて好氣的に行われる。反応時間は基質濃度ならびにその他の反応条件により異なるが24～120時間で終了するのがよい。好ましくはガスクロマトグラフィー等の分析によりラセミ体〔1〕の残存基質量が初期基質濃度に比して50%で反応を終了するか、あるいは目的とする光学活性体の光学純度を測定して終点を決定するのがよい。すなわち基質であるラセミ体〔1〕中のR体〔1〕が全て分解資化された時点で反応を停止するのがよい。この様にして反応液中に残存するS体〔1〕は一般的な方法で回収および精製できる。例えば反応液から菌体を遠心分離で除いた後、上清をエバポレーターにより濃縮し、酢酸エチル等の溶媒で抽出する。次いで抽出液を無水硫酸マグネシウムにより脱水した後、減圧下で溶媒を除去しS体〔1〕のシロップを得ることができる。さらに蒸留により精製してもよい。

【0011】本発明に使用される微生物は、R体〔1〕の資化能を有し、R体〔1〕を単一炭素源として資化増殖することのできるシュドモナス (Pseudomonas) 属に属する微生物であり、具体的にはシュドモナス sp. D S-S I-5 株を挙げることができる。本菌株は生理学的、菌学的諸性質からシュドモナス (Pseudomonas) 属に属する菌と同定され、既に工業技術院生命工学工業技術研究所に寄託番号FERM P-17596として寄託されている。以下実施例をもって、本発明をさらに具体的に説明するが、本発明はこれらの例に限定されるものではない。なお、実施例中の%は特に記載のない限り% (W/V) を表す。

【0012】

【発明の実施の形態】実施例1

下記の組成:

硫酸アンモニウム	0.5%
リン酸第2ナトリウム	0.02%

リン酸第2カリウム	0.02%
リン酸第1ナトリウム	0.04%
硫酸マグネシウム	0.05%
硫酸鉄	0.001%
硫酸銅	0.0001%
硝酸マンガン	0.0001%
炭酸カルシウム	0.45%
pH	6.9

【0013】からなる培地100mlを入れた500ml容のバッフル付き三角フラスコを121℃で15分間、加圧蒸気滅菌後、ラセミ体3-クロロ-1, 2-プロパンジオールを1ml (1.3g)を添加し、ラセミ体3-クロロ-1, 2-プロパンジオールを単一炭素源とする完全合成培地を作製した。次いで、ペプトン、酵母エキス、D-グルコース各1%からなる傾斜寒天栄養培地にて予め培養した微生物シュードモナスsp. DS-SI-5株を白金耳、上記完全合成培地に無菌的に接種し、30℃、130rpmの振とう条件で2日間培養した。その時の反応液中に残存する3-クロロ-1, 2-プロパンジオールをガスクロマトグラフィー (GLサイエンス社製のカラム担体: PEG 20M, 60-80メッシュ (0.31-0.42mm) で分析した結果、その残存率は45%であった。培養終了後、培養液を取り出し、遠心操作により菌体を除去し、上清液を得た。この上清液をエバポレーターで2mlにまで濃縮し、酢酸エチルにより抽出した。続いて無水硫酸マグネシウムにより脱水後、減圧下で酢酸エチルを除去し、3-クロロ-1, 2-プロパンジオールのシロップを0.51g得た。

【0014】本物質の光学純度の測定は、得られた3-クロロ-1, 2-プロパンジオールの光学異性体を水酸化ナトリウム水溶液を用いたアルカリ処理により相当するグリシドールの光学異性体に変換後、アステック社製のキャピラリーカラムG-TA [(0.25mm (ID) x 30m (Length))]を用いたガスクロマトグラフィーにより光学異性体の分析を行なった [Suzuki et al., Appl. Microbiol. Biotechnol., Vol. 40, 273-278 (1993)]。その結果、得られた3-クロロ-1, 2-プロパンジオールは光学純度99%eeのS体3-クロロ-1, 2-プロパンジオールであった。

光学異性体の分析条件: カラム温度, 45℃; 検出器温度, 200℃; キャリヤーガス, 窒素; 流速, 0.5ml/min; 検出器, FID; スプリット比, 200/1。グリシドールのリテンションタイム: R体, 80.6分; S体, 82.1分。

【0015】実施例2

ペプトン、酵母エキス、D-グルコース各1%からなる組成の栄養培地100ml (pH7.2)を入れたバッフル付きの三角フラスコ (500ml容) を121℃、15分間、加圧蒸気滅菌し、液体栄養培地を作製した。予

め上記組成の傾斜寒天栄養培地にて培養した微生物シュードモナスsp. DS-SI-5株の白金耳量を上記液体栄養培地に接種し、30℃、130rpmの振とう条件で24時間培養した。得られた菌体を遠心分離操作により集菌し、菌体を50mMのリン酸緩衝溶液 (pH7.2) にて2回洗浄し、洗浄菌体を調製した。次いでこの菌体を実施例1に示したラセミ体3-クロロ-1, 2-プロパンジオールを単一炭素源とする培地101mlに懸濁し、30℃、130rpmで2日間反応させた。反応液に残存する3-クロロ-1, 2-プロパンジオールの残存率を実施例1と同様の方法で測定した結果、46%であった。反応終了後、遠心分離操作により菌体を除去し上清液を得た。上清液からの3-クロロ-1, 2-プロパンジオールの回収は実施例1と同様に行い、0.52gを分取した。得られた本物質の光学純度を実施例1と同様の方法で分析した結果、光学純度99%eeのS体3-クロロ-1, 2-プロパンジオールであった。

【0016】実施例3

下記の組成:

硫酸アンモニウム	0.5%
リン酸第2ナトリウム	0.02%
リン酸第2カリウム	0.02%
リン酸第1ナトリウム	0.04%
硫酸マグネシウム	0.05%
硫酸鉄	0.001%
硫酸銅	0.0001%
硝酸マンガン	0.0001%
pH	6.9

からなる培地2.5Lを入れた5L容培養器 (ジャーファーマンター、ミツワ理化学社製、Model KMJ5B) を121℃、15分間加圧蒸気滅菌後、ラセミ体3-クロロ-1, 2-プロパンジオールを25ml (32.5g)添加し、ラセミ体3-クロロ-1, 2-プロパンジオールを単一炭素源とする完全合成培地を作製した。次いで微生物シュードモナスsp. DS-SI-5株を予めペプトン、酵母エキス、D-グルコース各1%からなる栄養培地で30℃、24時間振とう培養し、この培養液50ml [2% (v/v) 量]を上記ラセミ体3-クロロ-1, 2-プロパンジオールを単一炭素源とする完全合成培地に無菌的に接種した。そして以下の条件で3日間通気攪拌培養を行った。

温度	30℃
通気量	0.5L/min
回転数	500rpm

【0017】なお、pHの測定および制御は連動させたpHコントローラーを用いて行い、3mol/L濃度の水酸化ナトリウム水溶液によりpH6.9に制御した。また、本物質の定量ならび同定は実施例1と同様の方法により行った。培養終了後、培養液より遠心分離操作により生育した菌体を除去し、上清液を得た。上清液からの3-

クロロ-1, 2-プロパンジオールの回収は実施例1と同様に行い、13.7gを分取した。実施例1と同様の方法で本物質の光学純度を測定したところ、99%eeのS体3-クロロ-1, 2-プロパンジオールであった。

【0018】実施例4-6

実施例1-3におけるラセミ体3-クロロ-1, 2-プロパンジオールをラセミ体3-ブロモ-1, 2-プロパンジオールに替えて実験を行った。実験方法ならびにその他の操作はそれぞれ実施例1-3に従って行い、それぞれ分取された3-ブロモ-1, 2-プロパンジオールの光学純度の測定ならびに立体配置の測定は、実施例1と同様の方法で行った。その結果、得られた3-ブロモ-1, 2-プロパンジオールはいずれも光学純度96% eeのS体3-ブロモ-1, 2-プロパンジオールであった。S体3-ブロモ-1, 2-プロパンジオールの残存量はそれぞれ0.24g、0.28g、6.2gであった。

【0019】

【発明の効果】本発明によればR体3-ハログノ-1, 2-プロパンジオールの資化能を有するシュードモナス属に属する微生物、殊にシュードモナス (Pseudomonas)

- 05 sp. DS-SI-5株を、ラセミ体3-ハログノ-1, 2-プロパンジオールを基質として含有する培地中、殊に該ラセミ体を単一炭素源とする培地中で培養することにより、R体3-ハログノ-1, 2-プロパンジオールを優先的に資化分解させ、S体3-ハログノ-1, 2-プロパンジオールを安価で、かつ工業的に簡便な方法で製造することができる。また、本発明によれば、S体3-ハログノ-1, 2-プロパンジオールの工業的スケールで大量生産を行う場合にも、多量の菌体を別途に培養し調製する必要がなく、種菌(スターター)としての分量だけを培養し、接種するだけでよい。つまり極言するならば一細胞の微生物がいればよい。
- 10
- 15

フロントページの続き

(72)発明者 中川 篤

大阪府大阪市西区江戸堀1丁目10番8号
ダイソー株式会社内

(72)発明者 笠井 尚哉

大阪府泉南郡熊取町大久保南4丁目3番24号

25 Fターム(参考) 4B064 AC02 CA02 CC03 CD06 CD27
DA01 DA11